

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/BR05/000036

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: BR
Number: 0400284-9
Filing date: 18 March 2004 (18.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 April 2005 (20.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse




REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

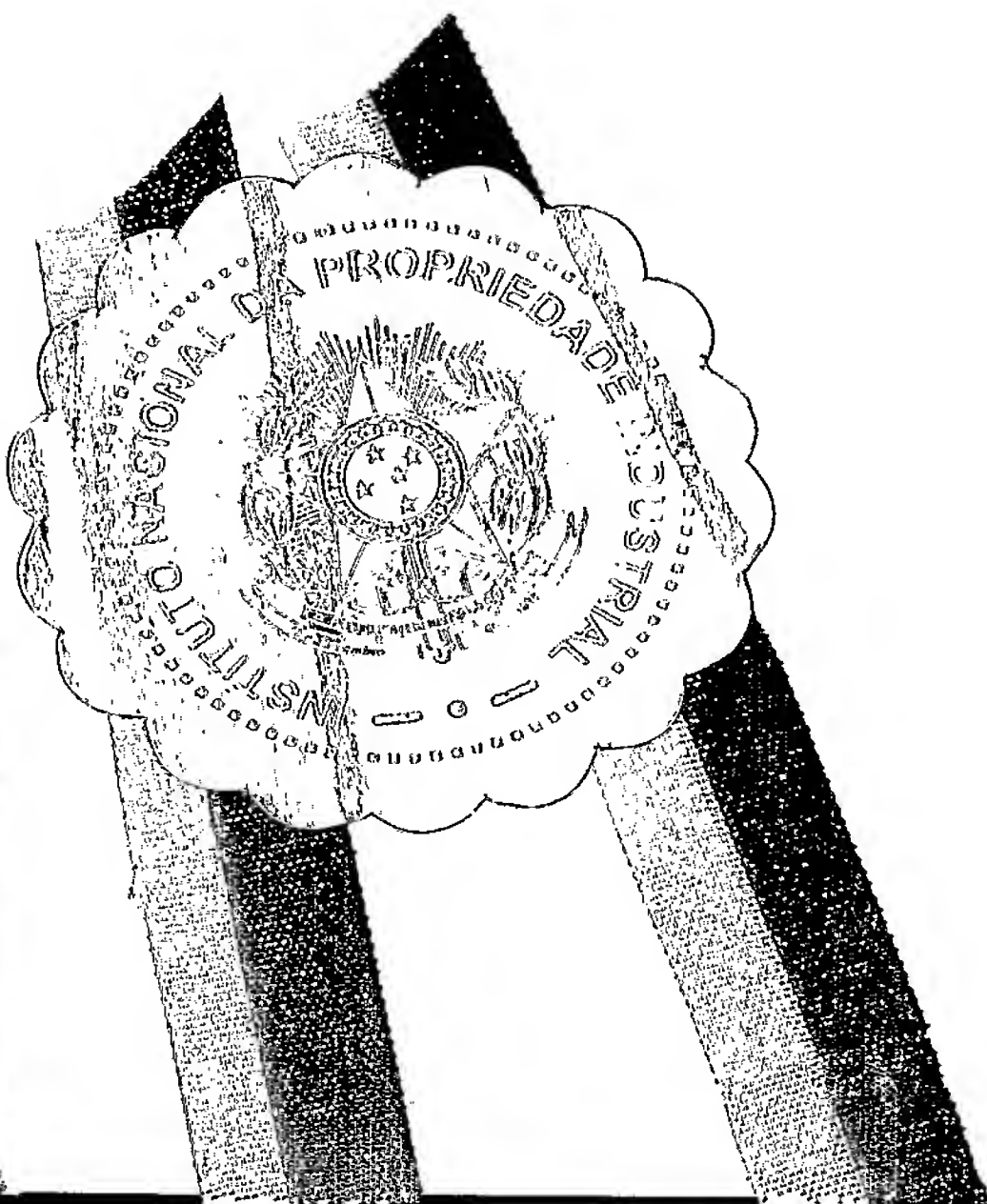
CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

**O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção.
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0400284-9 de 18/03/2004.**

Rio de Janeiro, 07 de Abril de 2005.


Oscar Paulo Bueno
Chefe do SEPDOC
Mat: 0449117



SEDE
18 MAR 11 27 002569
DEPÓSITOS DE PATENTES

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição

PI0400284-9

depósito / /

e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

1.2 Qualificação: ENTIDADE PÚBLICA 1.3 CGC/CPF: 33781055000135

1.4 Endereço completo: AVENIDA BRASIL, 4365, MANGUINHOS
21045900, RIO DE JANEIRO, RJ

1.5 Telefone:

FAX:

☐ continua em folha anexa

2. Natureza:

☒ 2.1 Invenção ☐ 2.1.1. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

Uso de DM 43 e seus fragmentos como inibidor de metaloproteases de matriz

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do pedido nº. , de

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:
Nº de depósito Data de Depósito (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

☐ continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)

7.1 Nome: **PATRÍCIA BARBOSA JURGILAS**

7.2 Qualificação: **BIOLOGA**

7.3 Endereço: **AVENIDA BRASIL, 4365, MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO, RJ**

7.4 CEP: **21045900**

7.5 Telefone

☒ continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

☐ em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

☐ em anexo

10. **Procurador (74):**

10.1 Nome **BHERING, ALMEIDA E ASSOCIADOS**

CPF/CGC: **02917066000176**

10.2 Endereço: **RUA BENEDITINOS, 16, 11º ANDAR, RIO DE JANEIRO, RJ**

10.3 CEP: **20081050**

10.4 Telefone (21) **25166698**

11. **Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):**
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	18 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.2 Procuração	01 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	01 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	13 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros (especificar): DECLARAÇÃO				01 fls.
	11.10 Total de folhas anexadas:				36 fls;

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

Rio de Janeiro, 17/03/2004

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Kátia F. de Almeida (API 1021)

Bhering, Almeida & Associados

Bhering, Almeida & Associados S/C Ltda.

Rua Beneditinos, 16 - 11.º Andar - Centro

CEP 20081-050 - Rio de Janeiro - RJ

TÍTULO (54): USO DE DM 43 E SEUS FRAGMENTOS COMO INIBIDOR DE
METALOPROTEASES DE MATRIZ

FOLHA ANEXA DOS NOMES DOS INVENTORES (72):

- Juliana de Meis
Qualificação: Bióloga
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Richard Hemmi Valente
Qualificação: Biólogo
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Ana Gisele da Costa Neves Ferreira
Qualificação: Pesquisadora
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Daniella Areas Mendes da Cruz
Qualificação: Biomédica
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Désio Aurélio Farias de Oliveira
Qualificação: Biólogo
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Wilson Savino
Qualificação: Biólogo
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil
- Gilberto Barbosa Domont
Qualificação: Químico
Rua Cel Eurico de Souza Gomes Filho 375 apto 101, Jardim Oceânico
CEP: 22620-320, Rio de Janeiro, Brasil
- Jonas Enrique Perales Aguilar
Qualificação: Biólogo
Avenida Brasil, 4365, Manguinhos
CEP: 21045900, Rio de Janeiro, Brasil

USO DE DM43 E SEUS FRAGMENTOS COMO INIBIDOR DE METALOPROTEASES DE MATRIZ

Campo da Invenção

A presente invenção, em seu conceito mais amplo, se
5 refere ao uso da proteína DM43 como inibidor de
metaloproteases. Mais particularmente, a presente invenção
está relacionada ao uso de DM43 para tratamento terapêutico
na inibição de metaloproteases de matriz, e uma composição
farmacêutica consistindo da proteína DM43 com um veículo
10 farmaceuticamente aceitável.

Fundamentos da Invenção

A proteína DM43 é uma molécula conhecida, tendo sido
descrita sua purificação e caracterização como um inibidor
de metaloproteases de venenos de serpentes. Entretanto, o
15 estado da técnica não apresenta registro da capacidade da
DM43 em modular funções celulares como indução de apoptose,
aumento de depósito de componentes de matriz extracelular
e aumento da adesão celular.

Os inventores do presente pedido de patente já vem há
20 muitos anos investigando a resistência natural de
marsupiais a venenos de serpentes. Do soro do gambá
(*Didelphis marsupialis*) foi isolada e caracterizada uma
glicoproteína ácida de 43 kDa (DM43), capaz de inibir as
atividades de metaloproteases encontradas nos venenos de
25 serpentes (SVMPs) via formação de complexos não-covalentes
[(Neves-Ferreira et al., 2000) e (Neves-Ferreira et al.,
2002)].

As SVMPs pertencem à família das Metzincinas, cujos
membros possuem características comuns segundo suas

topologias, sequência consenso de ligação do zinco e um resíduo metionina conservado, que forma a base dos sítios ativos. Possuem identidade estrutural de cerca de 15% com as metaloproteases de matriz (MMPs), e 30% com as metaloproteases com domínio desintegrina similar (ADAMs)). (Nagase and Woessner, 1999)

As MMPs são uma família com 26 membros já descritos, que se destacam pela sua participação em vários processos fisiológicos (desenvolvimento fetal e regulação do sistema imune), e patológicos. O mais importante mecanismo de regulação da atividade das metaloproteases é a formação de complexo com seus inibidores naturais, os TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteases). A ruptura do balanço entre os TIMPs e as MMPs pode resultar nas mais diversas patologias como doenças articulares, cânceres, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, etc.

A mais comum doença articular em humanos é a osteoartrite que acomete cerca de 190 milhões de pessoas no mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde. A patogênese é consequência da degradação progressiva de componentes da matriz extracelular de cartilagens articulares de diartroses, como resultado da ação proteolítica das MMPs. Estas metaloproteases atingem níveis elevados em modelos animais, em cartilagens humanas e no líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (Janusz et al., 2002).

A terapêutica atual para pacientes com osteoartrite consiste no uso de antiinflamatórios, que visam apenas a diminuição da dor e minimização da incapacidade motora. Há

estudos que visam a inibição ou bloqueio de MMPs para o tratamento desta doença. Dentre estas, a MMP-3 vem sendo apontada como principal alvo molecular, já que é uma enzima que age sobre grande parte das proteínas de matriz extracelular, além de possuir a capacidade de ativar outras MMPs. Por ser superexpressas neste processo fisiopatológico é utilizada como marcador da doença (Lohmander et al., 1993).

Durante os últimos trinta anos, as MMPs foram consideradas alvos promissores na terapia do câncer. Esta teoria é sustentada pelo aumento da expressão gênica destas metaloproteases em tecidos malignos e pela sua capacidade em degradar componentes da matriz extracelular. Em muitos casos a progressão tumoral se relaciona com os níveis de expressão de MMPs. As alterações destes níveis, podem ainda evidenciar o comportamento invasivo das células tumorais, e sua habilidade de provocar metástase em experimentos com modelos animais (Coussens et al., 2002). Há estudos focalizando a inibição da atividade destas metaloproteases, empregando seus inibidores naturais, os TIMPs, ou o uso de compostos sintéticos capazes de inativar estas enzimas. Além disto, estuda-se a possibilidade de inibição da síntese das MMPs (Vincenti et al., 1994). Vários grupos já demonstraram que a superexpressão dos TIMPs é capaz de reduzir metástase experimental, apesar disto, dificuldades técnicas impossibilitaram até agora o uso dos TIMPs como potenciais drogas.

O uso dos inibidores sintéticos vem sendo testado na indústria farmacêutica, sem resultados relevantes até

agora, além de apresentarem baixa bioacessibilidade, podem
levar ao aparecimento de dores e inflamações severas como
efeitos colaterais. O estado da arte (Coussens et al.,
2002, tabela deste artigo) mostra que até o momento os
5 testes clínicos (Fase III) com os inibidores conhecidos não
apresentaram resultados relevantes.

Desta forma, a descoberta de um novo inibidor de
metaloproteases de matriz pode significar um avanço
terapêutico para patologias ainda sem perspectivas de
10 tratamento.

Sumário da Invenção

O objetivo principal da presente invenção é o uso
terapêutico da proteína DM43 como inibidor de
metaloproteases de matriz envolvidas em patologias tais
15 como cânceres e osteoartrite.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra a viabilidade celular em
fibroblastos normais murinos (3T3).

A Figura 2 mostra o ciclo celular em fibroblastos
20 normais murinos (3T3).

A Figura 3 mostra a apoptose em fibroblastos normais
murinos (3T3).

As Figuras 4A, 4B e 4C mostram, respectivamente, a
viabilidade celular, o ciclo celular e a apoptose com a
25 linhagem tumoral murina (EL4).

As Figuras 5A, 5B, 5C e 5D mostram a marcação de
componentes de matriz extracelular (fibronectina) em
fibroblastos normais murinos (3T3) do controle negativo e
das 3 diferentes concentrações de DM43.

As Figuras 6A, 6B, 6C e 6D mostram a adesão celular em linhagens de fibroblastos normais murinos (3T3) em cocultura com timócitos do controle negativo e das 3 diferentes concentrações de DM43.

13

5 A Figura 7 mostra o perfil do sobrenadante de fibroblastos normais murinos (3T3) quando submetido a cromatografia de afinidade acoplada com DM43.

10 A Figura 8 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) impregnado por prata, onde o numeral 1 significa o padrão de massa molecular, o numeral 2 significa o sobrenadante de fibroblastos e o numeral 3 a fração ligada à cromatografia de afinidade.

15 As Figuras 9A e 9B mostram os perfis de sobrenadante de adenocarcinoma de próstata (MDA) e mama (MCF7), respectivamente, quando submetidos a cromatografia de afinidade acoplada com DM43.

20 A Figura 10 mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) impregnado por prata, onde o numeral 1 significa o padrão de massa molecular, o numeral 2 significa o sobrenadante MDA, o numeral 3 significa a fração MDA não-ligada à cromatografia de afinidade, o numeral 4 fração MDA ligada à cromatografia de afinidade, 5 significa espaço vazio, o numeral 6 significa o sobrenadante MCF7, o numeral 7 significa a fração MCF7 não-ligada à cromatografia de afinidade e o numeral 8 significa a fração MCF7 ligada à cromatografia de afinidade.

25 A Figura 11 mostra a zimografia em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% do líquido sinovial de osteoartrite.

A Figura 12 mostra o resultado do ensaio de inibição utilizando caseína como substrato, onde osteo significa o líquido sinovial de osteoartrite, soro significa o soro de gambá e O+soro significa o líquido sinovial de osteoartrite incubado com soro total de gambá por 30 minutos a 37°C.

A Figura 13 mostra o perfil do líquido sinovial de osteoartrite quando submetido a cromatografia de afinidade acoplada com DM43.

A Figura 14A mostra a eletroforese em gel de poliacrilamida impregnado por prata do líquido sinovial de osteoartrite, onde o numeral 1 significa padrão de massa molecular, o numeral 2 significa o líquido sinovial, o numeral 3 significa o ligado em afinidade, o numeral 4 significa espaço vazio e o numeral 5 significa BSA.

A Figura 14B mostra a imunotransferência de amostras não reduzidas reveladas com anticorpo monoclonal anti-MMP-3, , onde o numeral 1 significa PM pré-corado) padrão de massa molecular pré-corado, o numeral 2 significa o líquido sinovial, o numeral 3 significa o ligado em afinidade, o numeral 4 significa BSA, como controle negativo.

A Figura 15 mostra as massas moleculares de diversas MMPs já descritas na literatura.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção será agora descrita através dos exemplos abaixo, os quais não devem ser interpretados de forma limitativa.

Na presente invenção os modelos fibroblastos murinos (3T3), linfomas murinos (EL4), adenocarcinomas humanos

(mama - MCF7 e próstada - MDA) e osteoartrite foram selecionados com base nos seguintes aspectos:

(i) fibroblastos murinos: principal linhagem celular normal produtora de MMPs;

5 (ii) linfoma de timo murino (EL4): linhagem celular tumoral de timo, a literatura mostra que linhagens tumorais superexpressam MMPs;

10 (iii) adenocarcinomas humanos (mama e próstada), linhagens tumorais superexpressam MMPs, principalmente nestes casos MMPs-2 e MMPs-9;

(iv) osteoartrite: principal doença articular em humanos, cuja patogênese é dada pela degradação progressiva de componentes da matriz extracelular de cartilagens de diartroses por MMPs.

15 **Exemplo 1 - Obtenção da proteína DM43**

A proteína DM43 foi obtida segundo método descrito por (Neves-Ferreira et al., 2000) e (Neves-Ferreira et al., 2002), aqui incorporado para referência.

20 O soro obtido de *Didelphis marsupialis*, capturados no Estado do Rio de Janeiro, de acordo com as normas recomendadas pelo IBAMA, foi submetido à diálise sob agitação por 24 horas, a 4°C, contra tampão acetato de sódio 0,01M pH 3,7 e centrifugado a 7.800xg (centrífuga refrigerada BECKMAN J2-21M) por 15 minutos a 10°C. O
25 sobrenadante foi fracionado por cromatografia de troca aniônica em gel de DEAE-Sephacel (2,5 x 30 cm). A eluição foi feita inicialmente de forma isocrática, seguida de um gradiente de 0,15-0,5M de NaCl no mesmo tampão de diálise, com velocidade de fluxo de 30mL/hora. A fração ativa foi

15

16

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
84



20

A linhagem celular de fibroblastos (1×10^5 células / garrafa) foi incubada em meio DMEM a 37°C. Após 24 horas, as células foram e desafiadas com 3 diferentes concentrações de DM43 (10, 250 e 1000ng/mL) por 20 horas a

5% de CO₂, 37°C. A análise da viabilidade foi realizada por exclusão celular utilizando o corante azul de Tripán em câmara de Neubauer. Este corante marca as células em processo de morte celular, por isso neste experimento contávamos apenas as células não marcadas, e portanto, viáveis.

Exemplo 5 - Ciclo celular

Os fibroblastos (1 x 10⁵ células / garrafa) após 24 horas de incubação como descrito acima, foram desafiados por 20 horas com 10; 250 e 1000ng/mL de DM43 a 5% de CO₂, 37°C. O ciclo celular foi avaliado utilizando 1ml do corante Vindelov O (Sigma Co.St.Louis, USA), composto por tris-HCl 3,4mM pH 7,6, iodeto de propídeo (PI) 0,75mM, NP-40 (v/v%, 0,1), ribonuclease de pâncreas bovino 700UL e NaCl 10mM.. (Vindelov and Christensen, 1990). Após 20 minutos a 4°C, as células e foram analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur® utilizando "software" Cell Quest. Este corante marca DNA, e dependendo da fase do ciclo que a célula esteja é observada maior ou menor fluorescência, evidenciada pelo marcador PI. A análise dos resultados foi feita por (área e largura), após aquisição em escala linear. Vale ressaltar, que 15000 células foram obtidas independentemente da área pré-determinada por parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC).

Exemplo 6 - Morte celular

Os fibroblastos foram mantidos em cultura (37° C, 5% CO₂) por 24 horas em meio DMEM e desafiados com (10; 250; 1000ng/mL de DM43) por 20 horas . Após este tempo, foram incubados com 20mg/mL do marcador 7-actinomicina D (7AAD)

15

Os experimentos de matriz extracelular foram realizados utilizando a mesma linhagem celular de fibroblastos, que foram incubadas com as mesmas concentrações de DM43 (10; 250 e 1000ng/mL) por 20h. Após este período, as células foram marcadas com anticorpo primário anti-laminina, fibronectina e colágeno. Após 30 minutos, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo secundário com fluoresceína. As células foram analisadas por microscopia óptica de fluorescência. Utilizamos como controle positivo a linhagem celular de estroma de medula (S17). Como controle negativo utilizamos uma Ig normal de coelho. Os anticorpos anti-fibronectina e anti-laminina foram utilizados na diluição de 1:100, já o anti-colágeno foi utilizado na concentração de 1:50.

Exemplo 8 - Adesão celular

A adesão celular foi realizada em linhagem de fibroblastos (1×10^5 células/poço) plaqueados por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após este tempo, as células foram desafiadas com o inibidor (10, 250 e 1000ng/mL) por 20h. Após este período, timócitos frescos isolados de camundongos Balb, foram adicionados a cultura (cerca de 50 timócitos por fibroblasto). A co-cultura ficou em estufa a 37°C a 5% de CO_2 por 30 minutos e posteriormente sob agitação por mais 30 minutos. Após, os timócitos que não aderiram ou ficaram fracamente aderidos foram retirados por inclinação da placa. As células restantes foram fixadas por metanol (MeOH) absoluto por 7 minutos, e coradas por corante de Gimsa (cora apenas os núcleos das células) por 30 minutos. As células foram então lavadas com água destilada e analisadas por microscopia óptica. Para fazer análise total da adesão, os timócitos que não aderiram ou ficaram fracamente aderidos foram retirados por inclinação da placa e os aderidos foram lavados e contados em câmara de Neubauer.

Exemplo 9 - Cromatografia de afinidade acoplada com DM43

O inibidor DM43 isolado conforme Exemplo 1 foi acoplado covalentemente a uma coluna de afinidade HiTrap® NHS de 1mL (Amersham Biosciences), de acordo com o manual de instruções. Os diferentes materiais (sobrenadantes de fibroblastos, adenocarcinomas de mama e de próstata; e o líquido sinovial de osteoartrite) foram precipitados com sulfato de amônio (80% de saturação) e submetidos a coluna, que foi equilibrada com tampão tris-HCl 0,02M + CaCl_2 0,02M

pH 7,5. As frações ligadas foram eluídas com tampão glicina-HCl 0,1M + CaCl₂ 0,02M pH 2,7, a uma velocidade de fluxo de 1mL/min a 4°C e coletadas sobre solução de tris 1M para neutralizar o pH das frações eluídas.

5 **Exemplo 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida e zimografia**

10 Todas as amostras e frações eluídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, de acordo com o método de (Laemmli, 1970). Os géis de concentração foram constituídos por 4% de bis-acrilamida e os géis de corrida foram utilizados na concentração de 12,5%. O tampão amostra foi utilizado na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol 5%). Utilizamos como tampão de corrida tris-glicina 0,05M pH 8,3, contendo 0,1% de SDS.

15 Todas as amostras foram aquecidas à 100°C por 5 minutos antes de serem aplicadas ao gel. Utilizamos o sistema Mini Protean II (BIO RAD). As corridas duravam em média 40 minutos, utilizando voltagem constante de 200V. Os géis foram impregnados por prata para revelação das bandas

20 protéicas.

Para verificação da atividade proteolítica das frações foi utilizada a técnica da zimografia, que foi realizada em gel de acrilamida 10% copolimerizado com caseína a 2%. As amostras (11,2 - 44,8µg proteína/poço de líquido sinovial)

25 foram preparadas em tampão contendo SDS e na ausência de agente redutor. A corrida teve duração total de 2 horas utilizando corrente constante de 15mA (por 1 hora) e 20mA (1 hora). Após a corrida, o gel foi transferido para tampão tris HCl 50mM pH 7,6 contendo 2,5% de triton x-100 por 1

hora. Após este tempo, o gel foi transferido para o tampão de lise tris HCl 50mM pH 7,8 contendo 150mM NaCl e 5mM de CaCl₂, por 24 horas a 37°C sob agitação.

Os géis foram corados com azul de Coomassie 0,1% R-250.

Exemplo 11 - Imunorevelação

As amostras foram eletrotransferidas após eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e agente redutor (β -mercaptoetanol 5%), para uma membrana de PVDF (Immobilon- P, 0,45 μ M), utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BIO RAD). As transferências duravam em média 1 hora, utilizando voltagem constante de 100V. A revelação foi feita com anticorpo monoclonal anti-MMP-3 produzido em ratos. O anticorpo secundário utilizado foi IgG anti-IgG de rato, conjugado com peroxidase (R & D systems).

Exemplo 12 - Inibição da atividade proteolítica

Após comprovação da atividade proteolítica do líquido sinovial de osteoartrite, foram realizados ensaios de inibição também utilizando a caseína (1%) como substrato. O soro total de gambá (2,8mg) foi incubado com o líquido sinovial (8,4mg) por 30 minutos a 37°C, antes de serem adicionados à caseína (500 μ L) contendo 25 μ L de CaCl₂ 0,08M por 1 hora a 37°C. A reação foi parada com TCA 5% (500 μ L), e a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi analisado por espectrofotometria (SHIMADZU) com leitura a 280nm.

Os resultados apresentados nas Figuras aqui anexadas demonstram uma diminuição na viabilidade dos fibroblastos utilizando as 3 concentrações de DM43 (10; 250 e 1000

21

ng/mL) (Fig.1). Esta diminuição poderia ser causada por um aumento de morte celular e/ou variação no ciclo celular. No ciclo celular de fibroblastos não observamos nenhum efeito significativo com nenhuma das doses utilizadas de tratamento (Fig.2). Já a análise com 7AAD demonstrou um aumento de apoptose nas células incubadas com DM43, corroborando os dados de celularidade. É evidente que a dose de 10ng/mL é a mais significativa neste fenômeno, triplicando o número de células apoptóticas em relação ao controle (Fig.3).

Os resultados obtidos com a linhagem celular EL4 mostraram a mesma tendência dos obtidos com fibroblastos, ou seja, uma diminuição na viabilidade das células, causada por morte celular, sem demonstrar modificação no ciclo destas células (Fig.4).

Nos experimentos de análise de componentes da matriz extracelular verificou-se grande depósito de fibronectina, principalmente utilizando a dose de 1000ng/mL de DM43 (Fig.5). Os outros componentes de matriz (laminina e colágeno IV) não apresentaram modificação.

DM43 induziu o aumento na adesão, o que parece ser dose dependente, aumentando de acordo com a dose de inibidor utilizada (Fig.6). Além disto, nota-se uma enorme formação de grumos de timócitos, o que tornou impossível a quantificação destes experimentos, conforma Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Adesão Celular (fibroblastos / timócitos)

Contagem adesão	Controle	DM43 (10ng/mL)	DM43 (250ng/mL)	DM43 (1000ng/mL)
Fibroblastos totais	399	354	nd	nd
Timócitos / fibroblastos	396	352	nd	nd
Timócitos totais	2116	2219	nd	nd
Índice de adesão	5,3%	6,3%	nd	nd

Porém, a análise da adesão total revelou um aumento significativo utilizando as doses de DM43, principalmente a de 1000ng/mL, conforme observado na Tabela 2 abaixo.

5 Tabela 2:

	Controle	DM43 (10ng/mL)	DM43 (250ng/mL)	DM43 (1000ng/mL)
Total de células	$7,5 \times 10^5$	$16,8 \times 10^5$	$15,3 \times 10^5$	$21,6 \times 10^5$

Este aumento de adesão de timócitos aos fibroblastos e estes à placa, sugere inibição das metaloproteases que estariam degradando componentes de matriz, o que corrobora os dados de aumento de depósito de fibronectina, principalmente com a maior dose utilizada.

Os resultados aqui apresentados, demonstraram que uma fração protéica do sobrenadante de fibroblasto foi capaz de interagir com DM43 acoplada a cromatografia de NHS (Fig.7). A análise desta fração por zimografia indica a presença de enzimas em seu conteúdo, já que foi capaz de hidrolisar a caseína copolimerizada a acrilamida. A análise eletroforética deste material demonstra a presença de 3 bandas protéicas principais (Fig.8). As massas moleculares de ≈ 92 , 66 e 28 kDa, corroboram com os valores de massa molecular reportados para as MMPs 2, 3 e 9, como mostra a Figura 15.

A MMP-3 pode apresentar-se em sua forma ativa com 28kDa.

Da mesma forma, frações protéicas dos sobrenadantes das linhagens tumorais foram capazes de ligar-se a DM43 (Fig.9) e hidrolisar a caseína. A análise eletroforética revela a presença de 2 principais bandas protéicas de ≈ 92 e 66 kDa na fração ligada de MDA. No caso de MCF7, 4 bandas protéicas de ≈ 98 , 92, 66 e 55 kDa foram visualizadas, como mostra a figura 10. Mais uma vez, estas massas podem sugerir a presença das MMPs 2, 3 e 9.

Após a confirmação da atividade proteolítica do líquido sinovial de osteoartrite por zimografia (Fig.11), este material foi submetido a ensaio de inibição utilizando caseína como substrato, onde foi verificado que a 280nm o líquido foi capaz de hidrolisar a caseína, e que quando incubado com o soro total de gambá foi totalmente neutralizado por este (Fig.12).

24

Quando o líquido sinovial foi submetido à cromatografia de afinidade, foi verificada a ligação de uma fração protéica (Fig.13). Esta fração analisada por SDS-PAGE revelou a presença de 2 bandas protéicas principais de ≈ 66 e 55kDa (Fig.14A). A imunorevelação por anticorpo monoclonal anti-MMP-3 confirmou a presença de MMP-3 (Fig.14B), indicando a interação de DM43 e MMP-3 presente no líquido sinovial de osteoartrite.

Estes dados pela primeira vez indicam a interação de um inibidor de metaloproteases de venenos de serpentes (DM43) com metaloproteases de matriz (MMPs). Além disto, em 4 diferentes modelos experimentais foi verificado a presença de bandas protéicas de semelhante migração eletroforética, que muito certamente correspondem às MMP-2, 3 e 9.

As composições farmacêuticas

As composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção consistem de uma quantidade efetiva da proteína DM43 e um veículo farmacêuticamente aceitáveis.

A composição pode estar na forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, ou na forma de soluções ou suspensões. As composições sólidas contêm o ingrediente ativo em mistura com excipientes não-tóxicos apropriados para a manufatura de comprimidos, tais como, amido, açúcar de leite, certos tipos de carbonatos e/ou bicarbonatos, fosfatos etc. Os comprimidos podem ser revestidos ou não, dependendo do ponto do trato gastrointestinal onde deve ocorrer a desintegração e absorção da droga. No caso de suspensões ou soluções aquosas, podem ser usados

excipientes como metil celulose, alginato de sódio, goma de acácia, lecitina etc e um ou mais aditivos, tais como conservantes, corantes, flavorizantes, espessantes etc.

26

5 Uma quantidade da proteína DM43 que será combinada com o veículo farmacêuticamente aceitável de forma a produzir a forma a dosagem apropriada. Na presente invenção as composições farmacêuticas podem conter, a proteína DM43 em concentrações preferenciais que variam , de 10 a 1000ng/mL.

10 A dose para qualquer paciente irá depender de vários fatores incluindo a atividade do composto específico empregado, a idade, peso corpóreo, quadro clínico geral, sexo, , dieta, tempo e via de administração, taxa de excreção, combinação com outras drogas e a severidade da
15 doença a ser tratada.

Reivindicações

1. Composição farmacêutica caracterizado por conter uma quantidade efetiva da proteína DM43 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

5 2. Composição de acordo com a reivindicação 1 caracterizada por concentrações efetivas da proteína DM43 na faixa de a 1000ng/mL.

10 3. Método para inibir metaloproteases em células humanas de acordo com as reivindicações 1 e 2, pela administração de uma quantidade efetiva da proteína DM43.

4. Método para tratamento de doenças tumorais em pacientes humanos caracterizado por administrar ao dito paciente uma quantidade efetiva da proteína DM43, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

15 5. Método para tratamento de tumores da mama, tumores da próstata, tumores da nuca, tumores da cabeça e tumores do pulmão, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

20 6. Método para tratamento de doenças do sistema nervoso central em pacientes humanos, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

7. Método para tratamento de doenças como esclerose múltipla e doença de Alzheimer, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

25 8. Método para tratamento de doenças articulares como osteoartrite em pacientes humanos, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

9. Uso da proteína DM43 no tratamento de humanos para inibir a presença de metaloproteases de matriz, de acordo com as reivindicações 1 e 2.

27

28

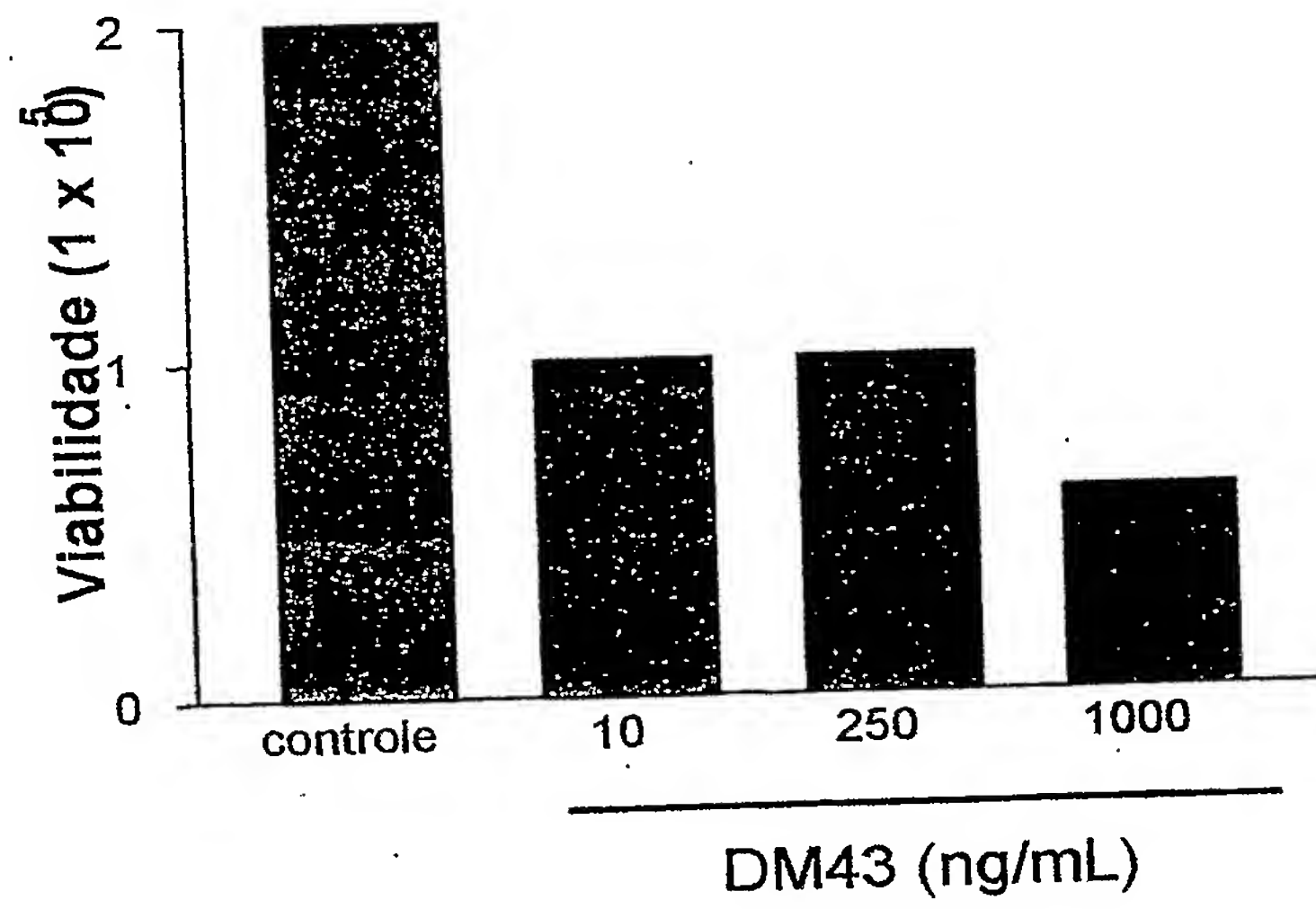


FIGURA 1

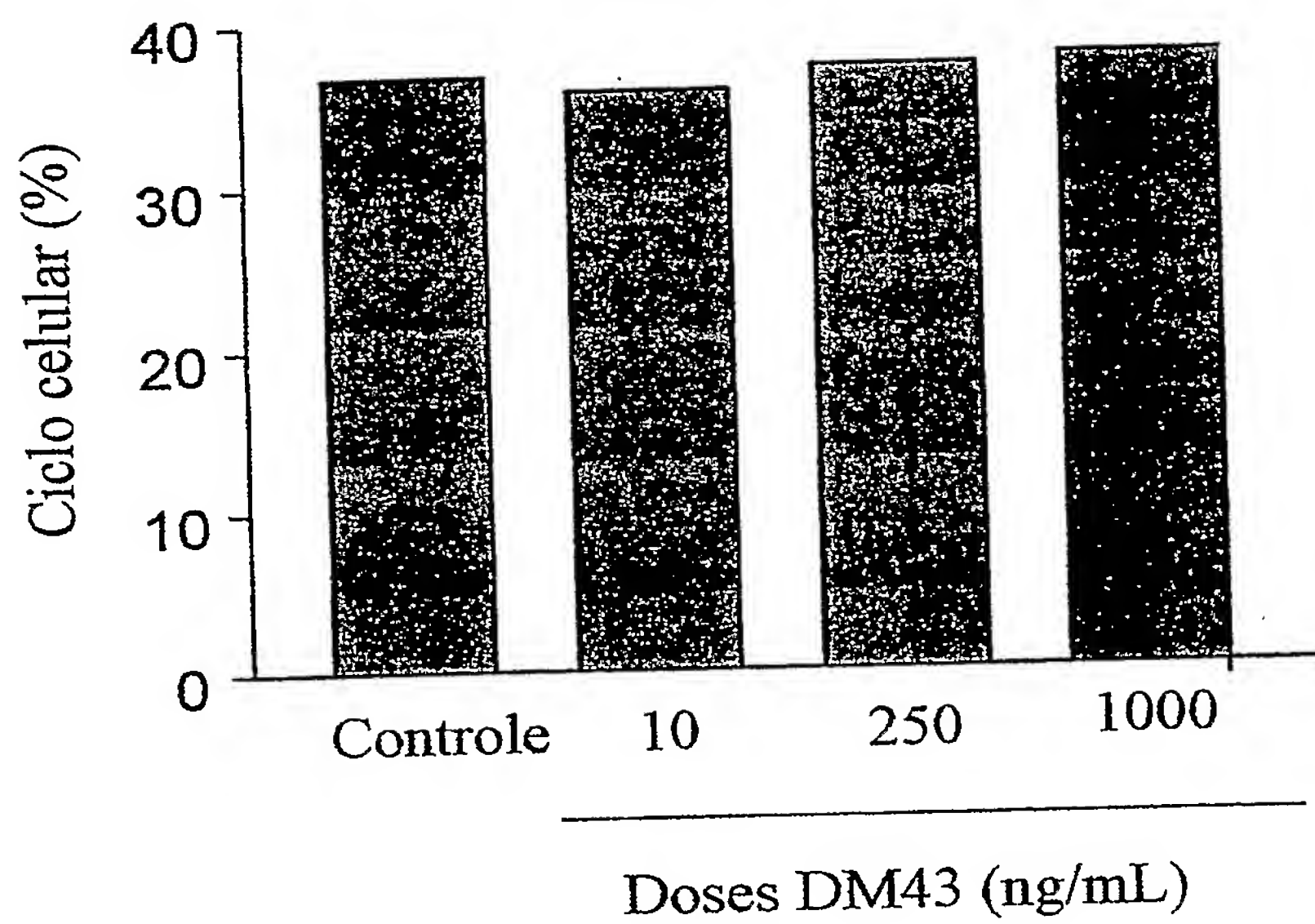


FIGURA 2

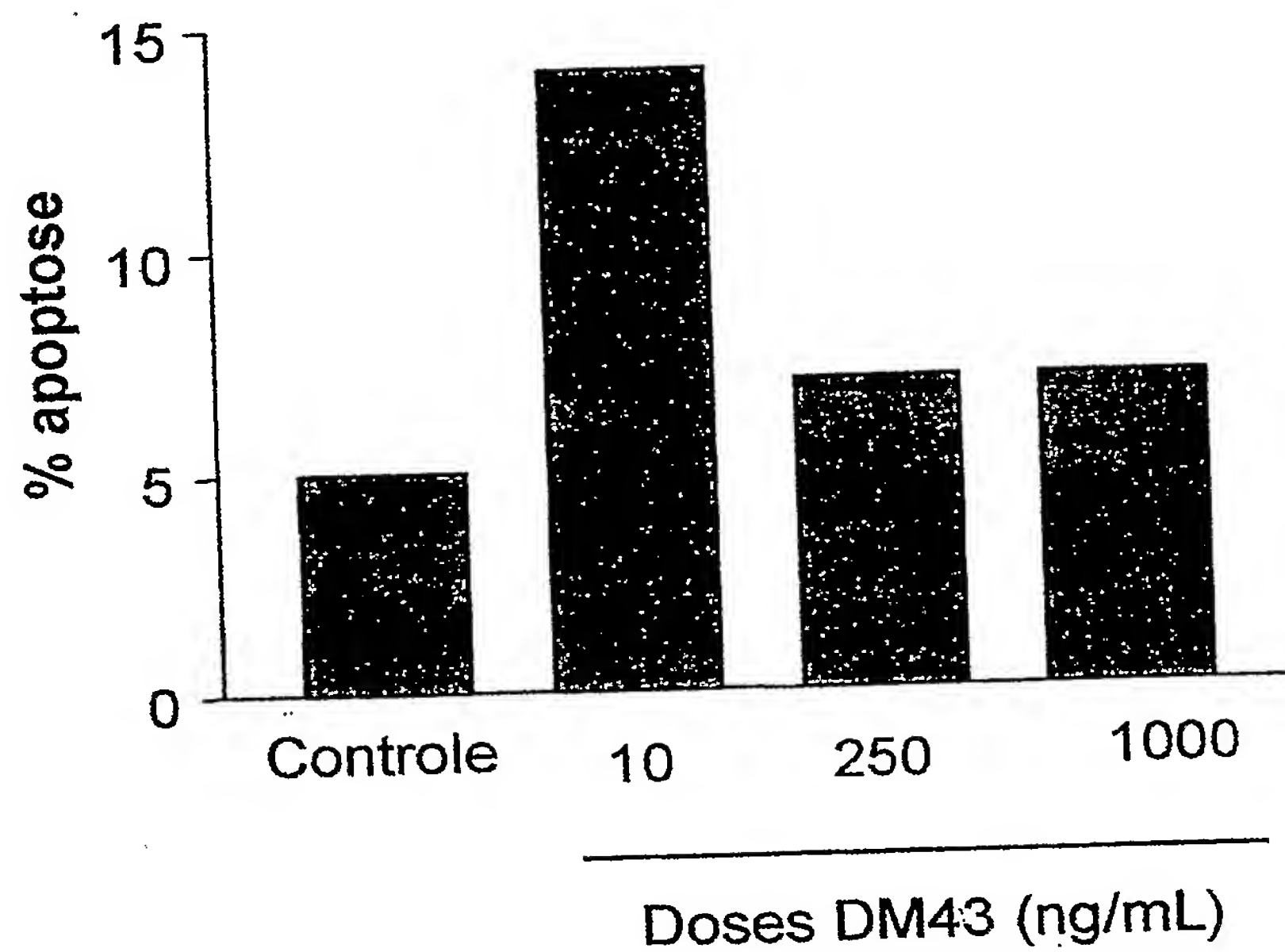


FIGURA 3

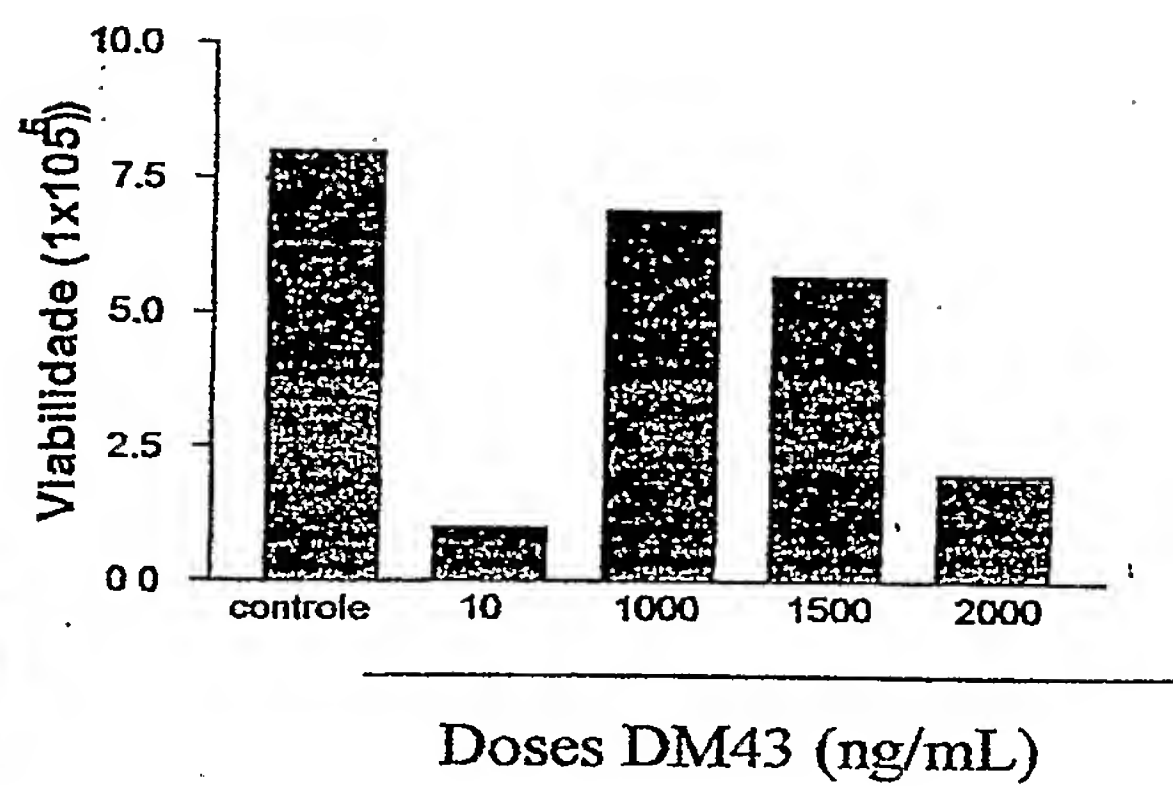


FIGURA 4A

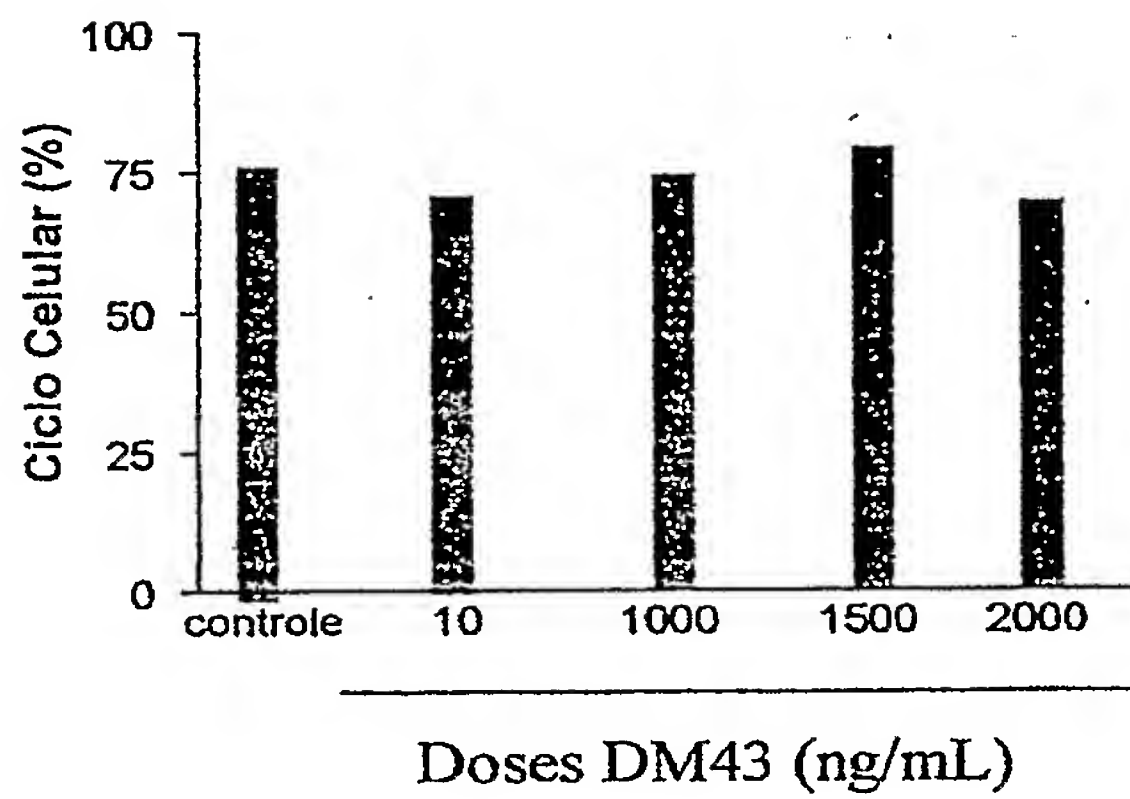


FIGURA 4B

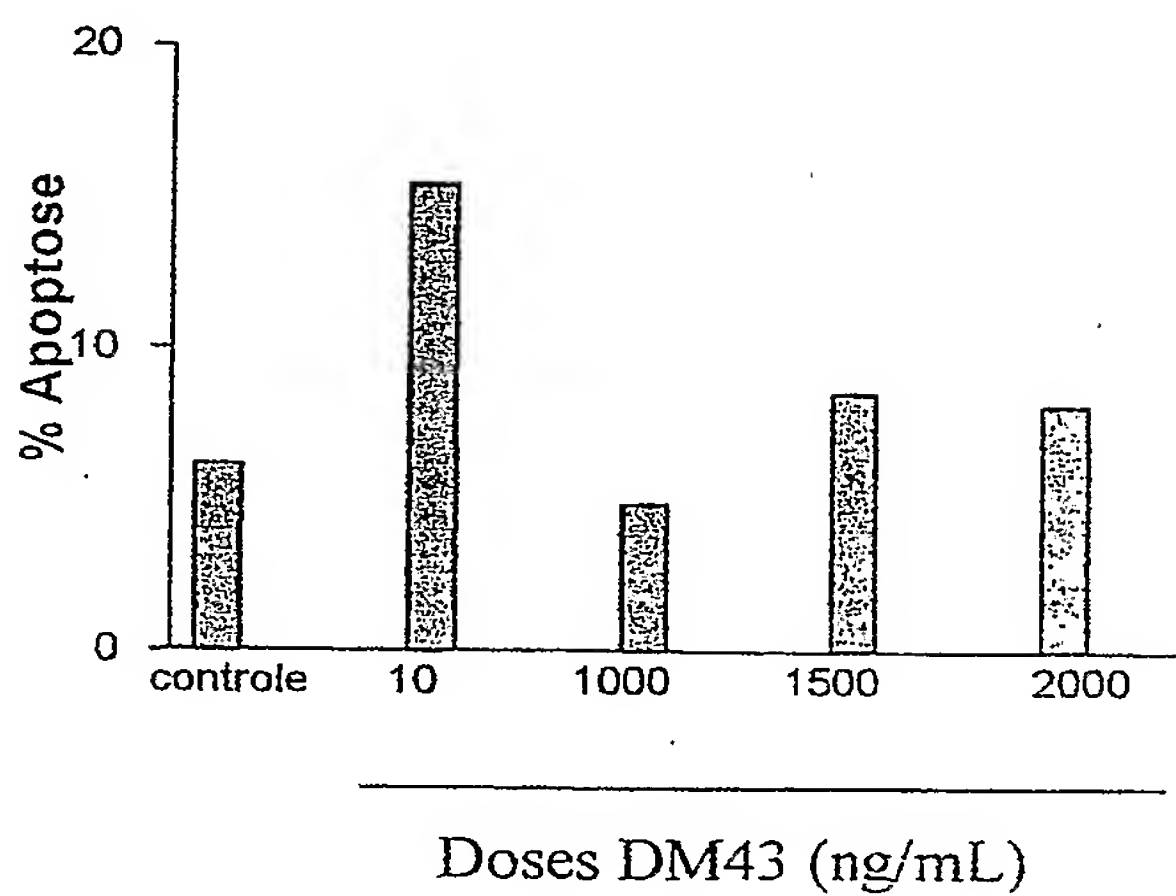
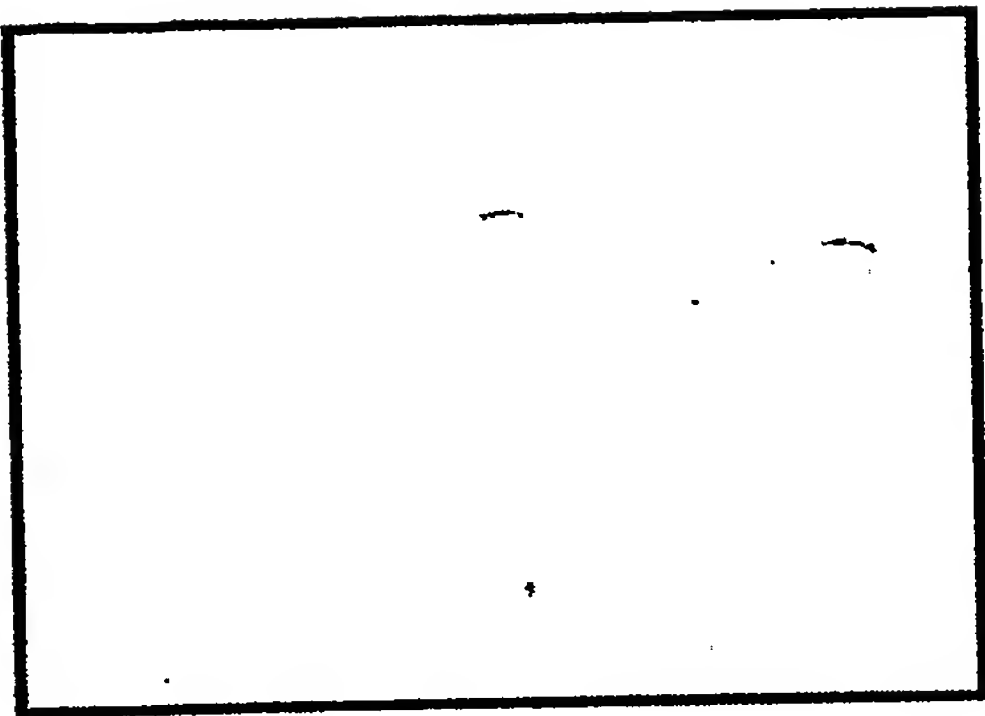
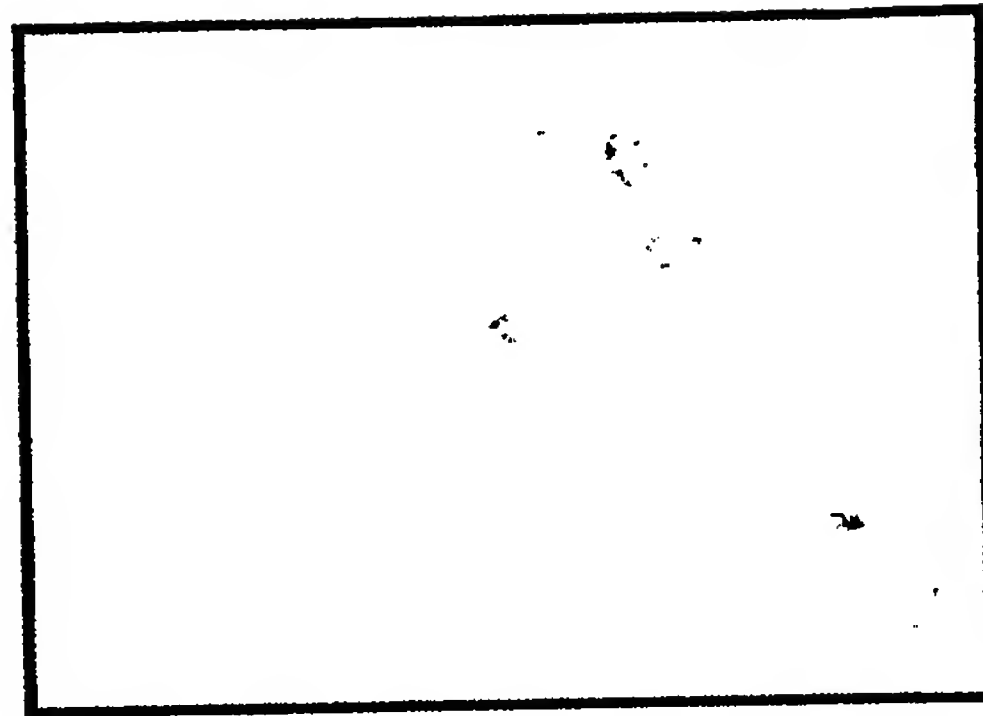


FIGURA 4C



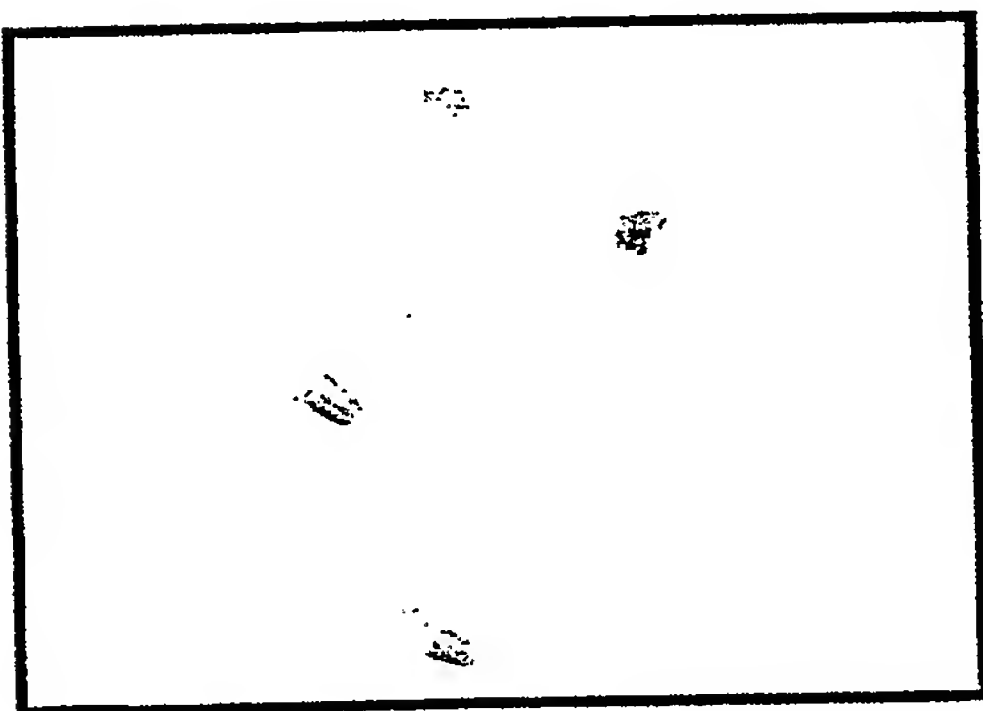
Controle

FIGURA 5A



DM43 (10ng/mL)

FIGURA 5B



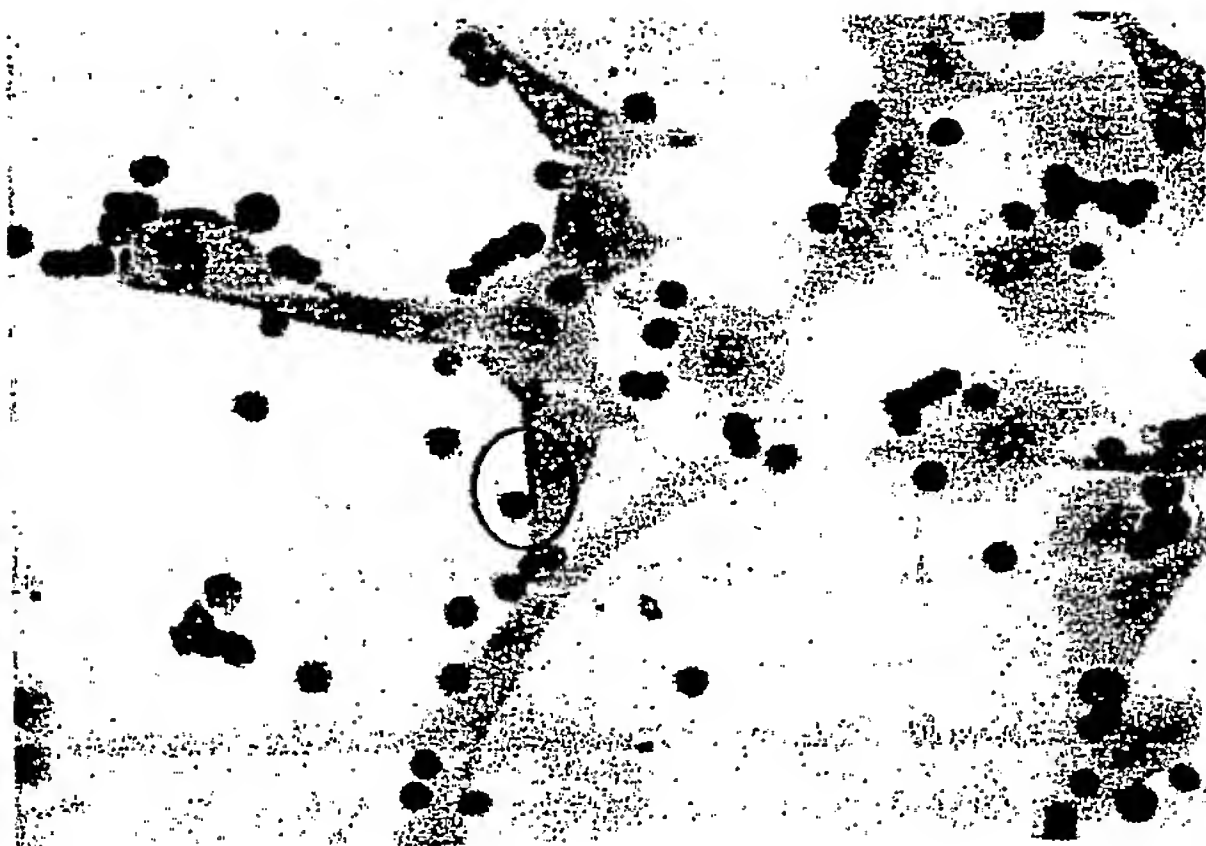
DM 43 (250ng/mL)

FIGURA 5C



DM43 (1000ng/mL)

FIGURA 5D



controle

FIGURA 6A



DM43 (10ng/mL)

FIGURA 6B



DM 43 (250ng/mL)

FIGURA 6C



DM43 (1000ng/mL)

FIGURA 6D

7/13

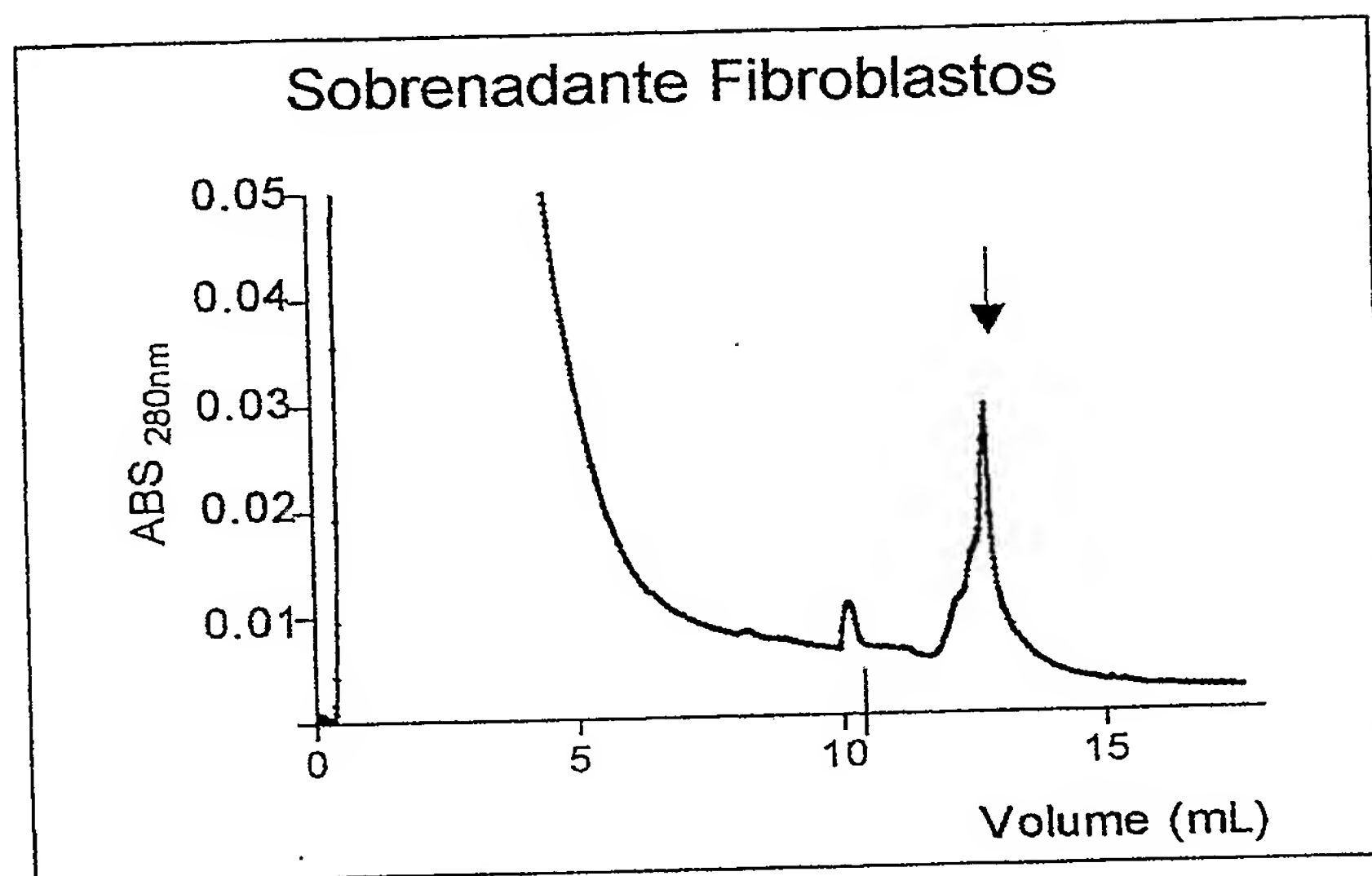


FIGURA 7

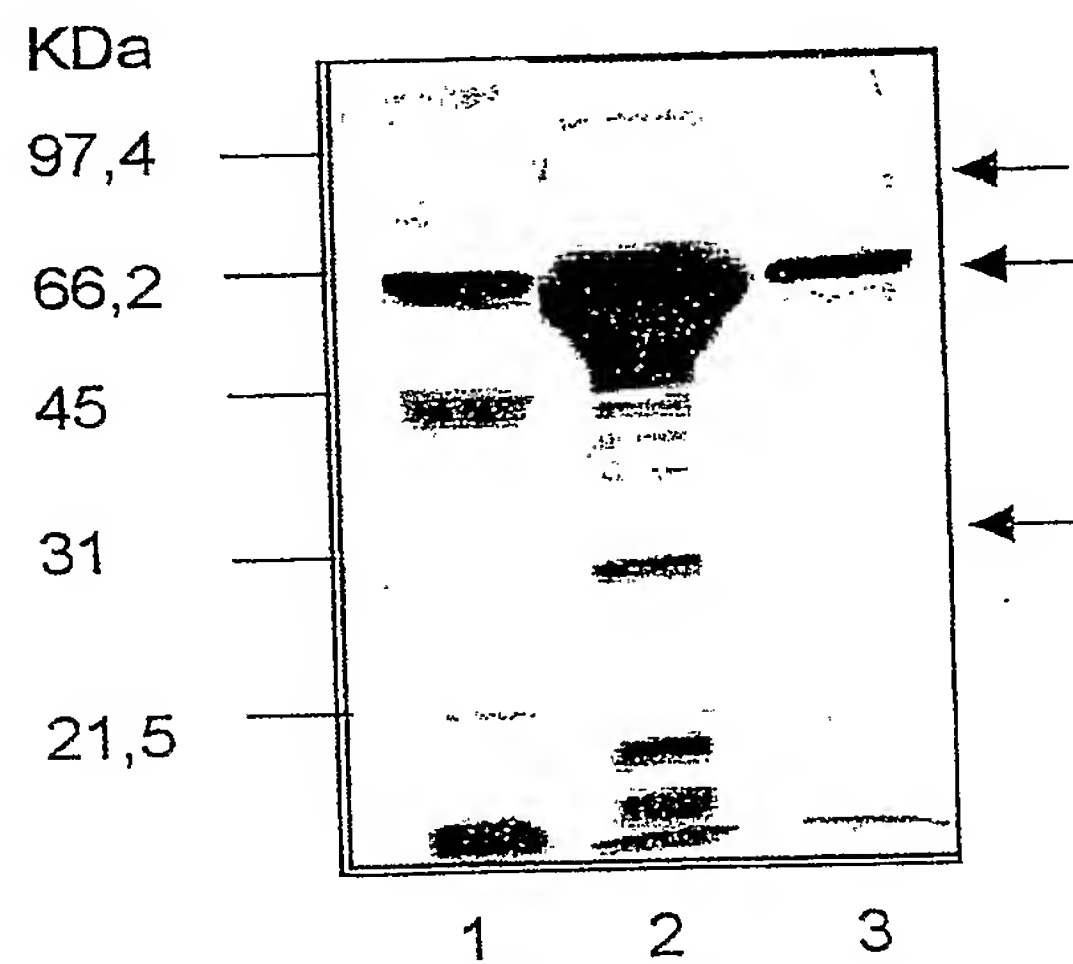


FIGURA 8

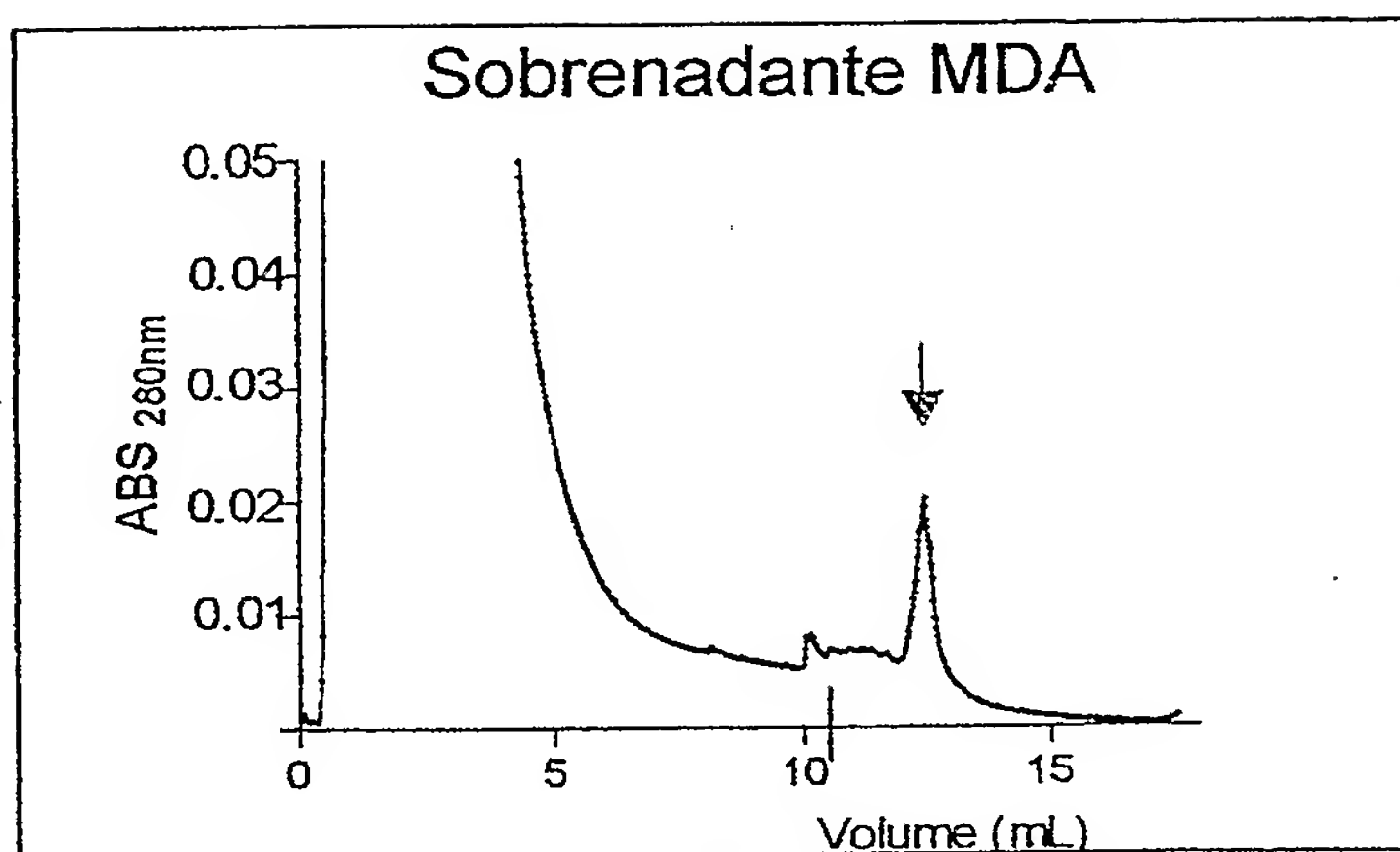


FIGURA 9A

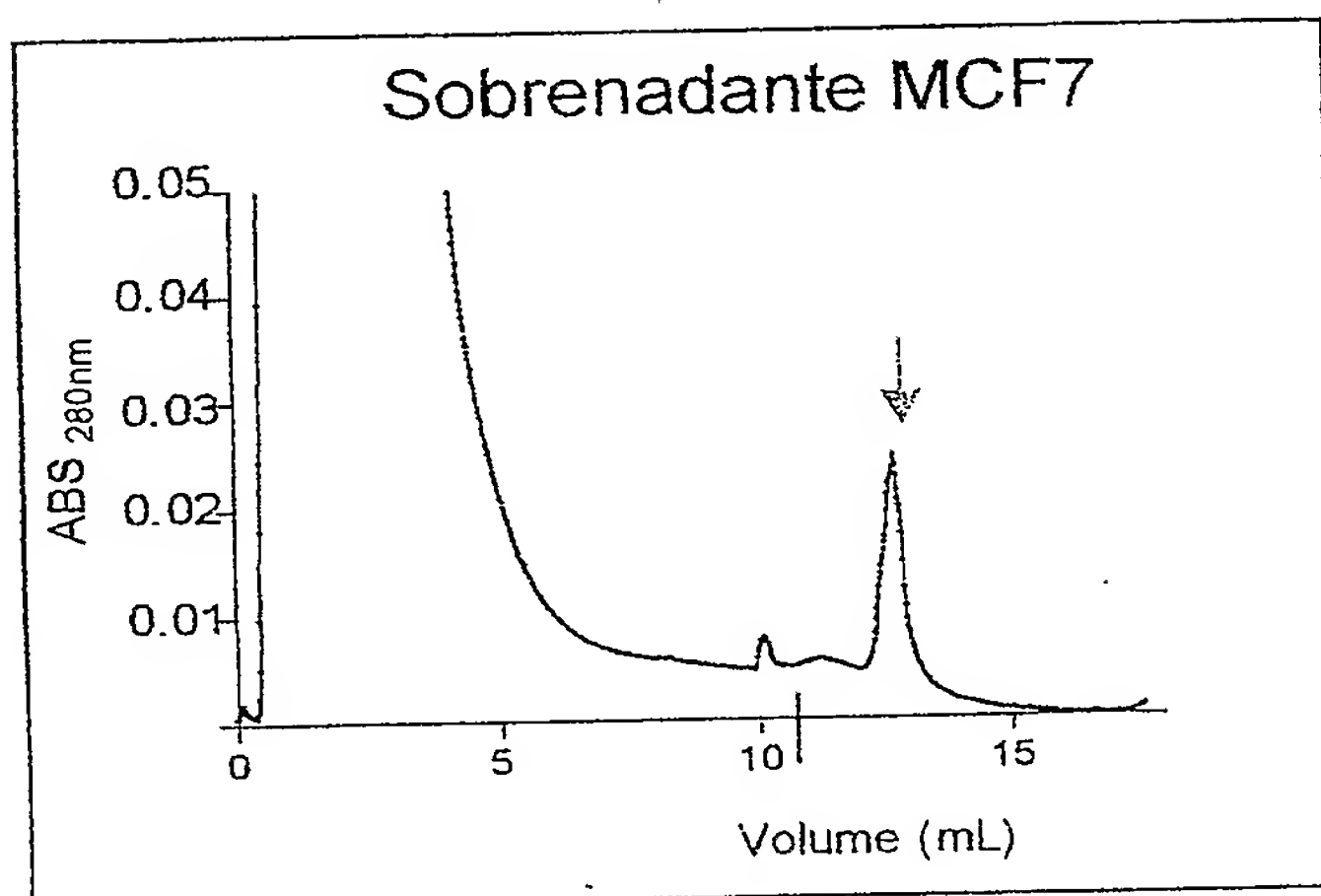


FIGURA 9B

36

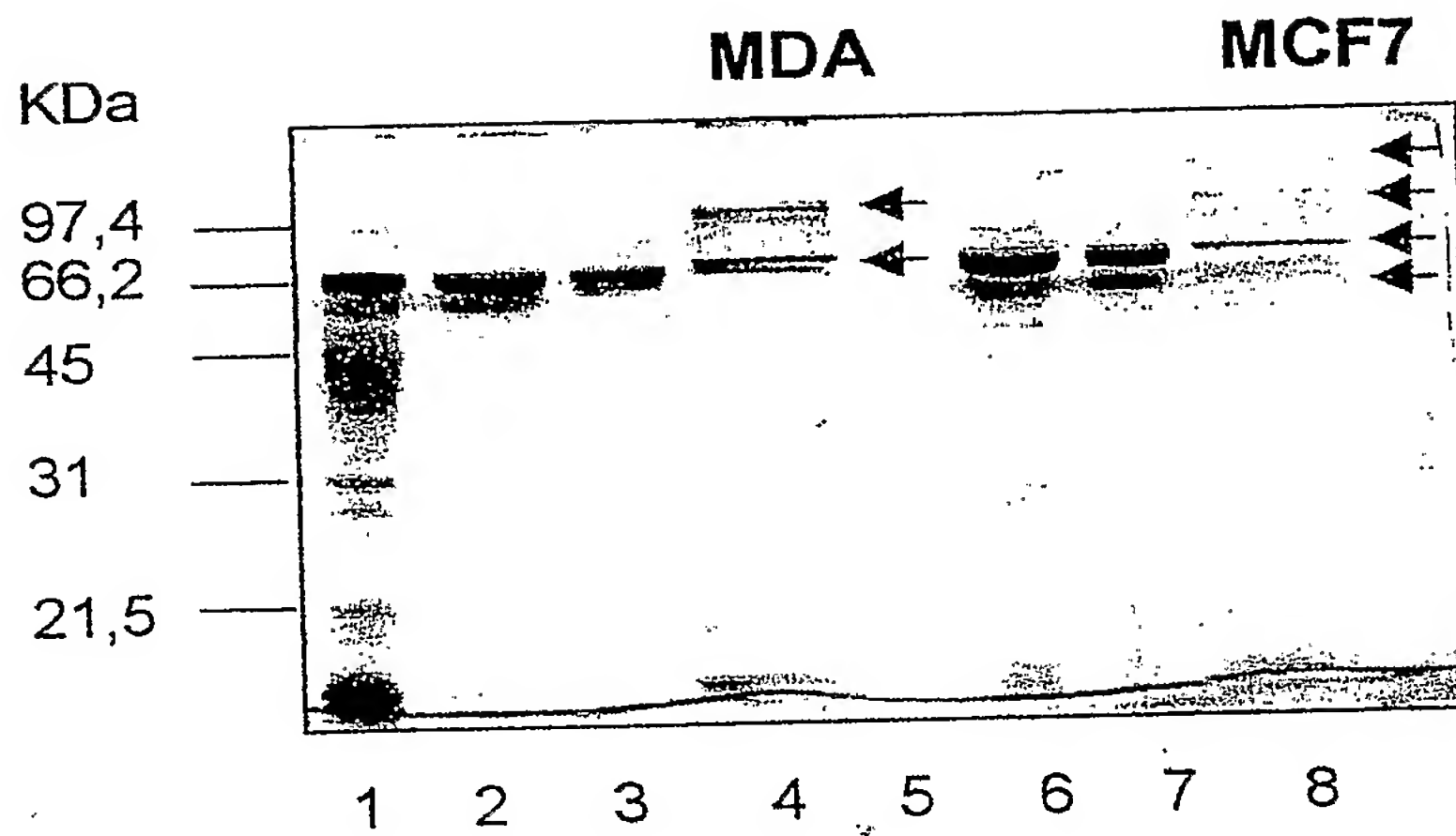
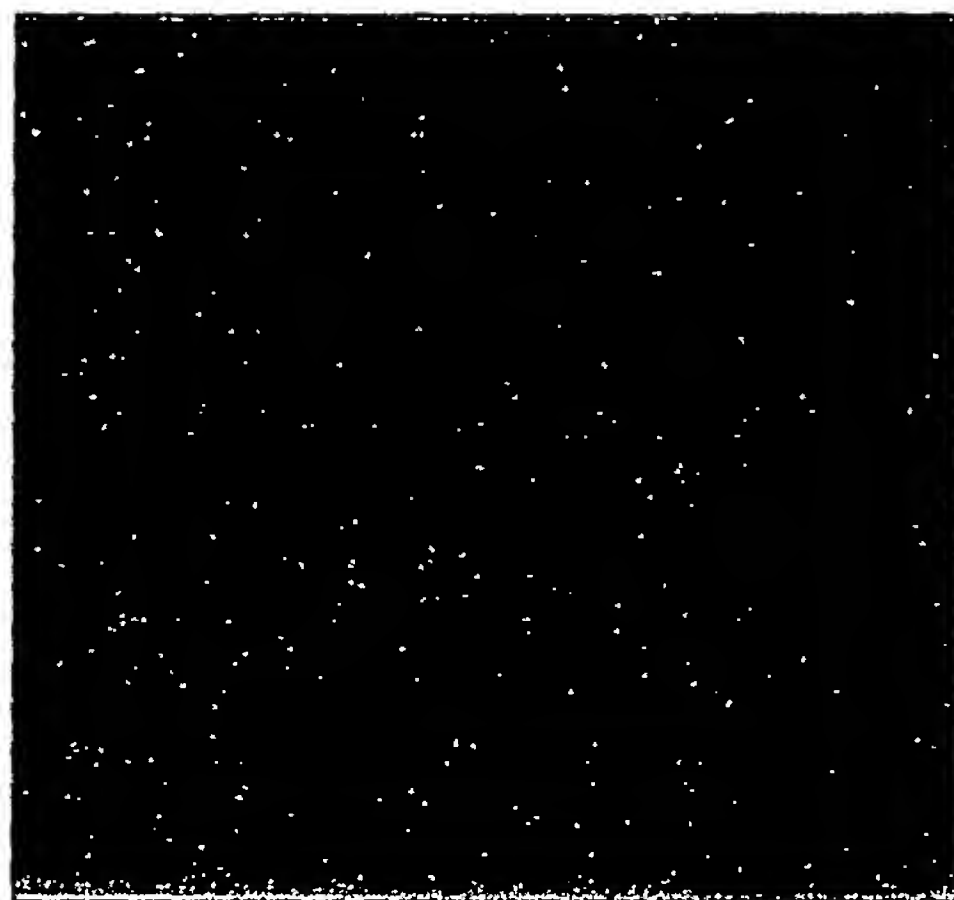


FIGURA 10

10/13



37

FIGURA 11

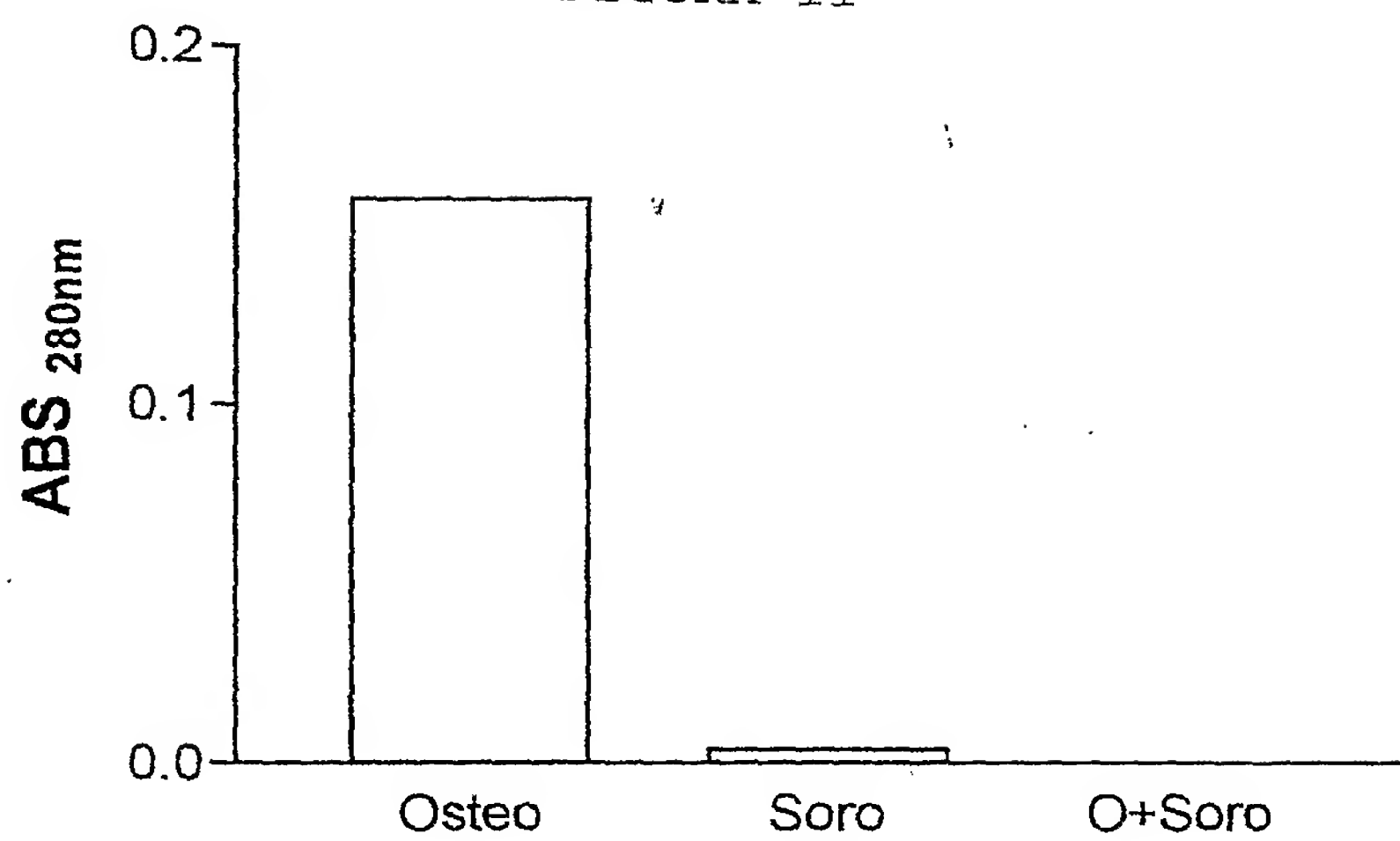


FIGURA 12

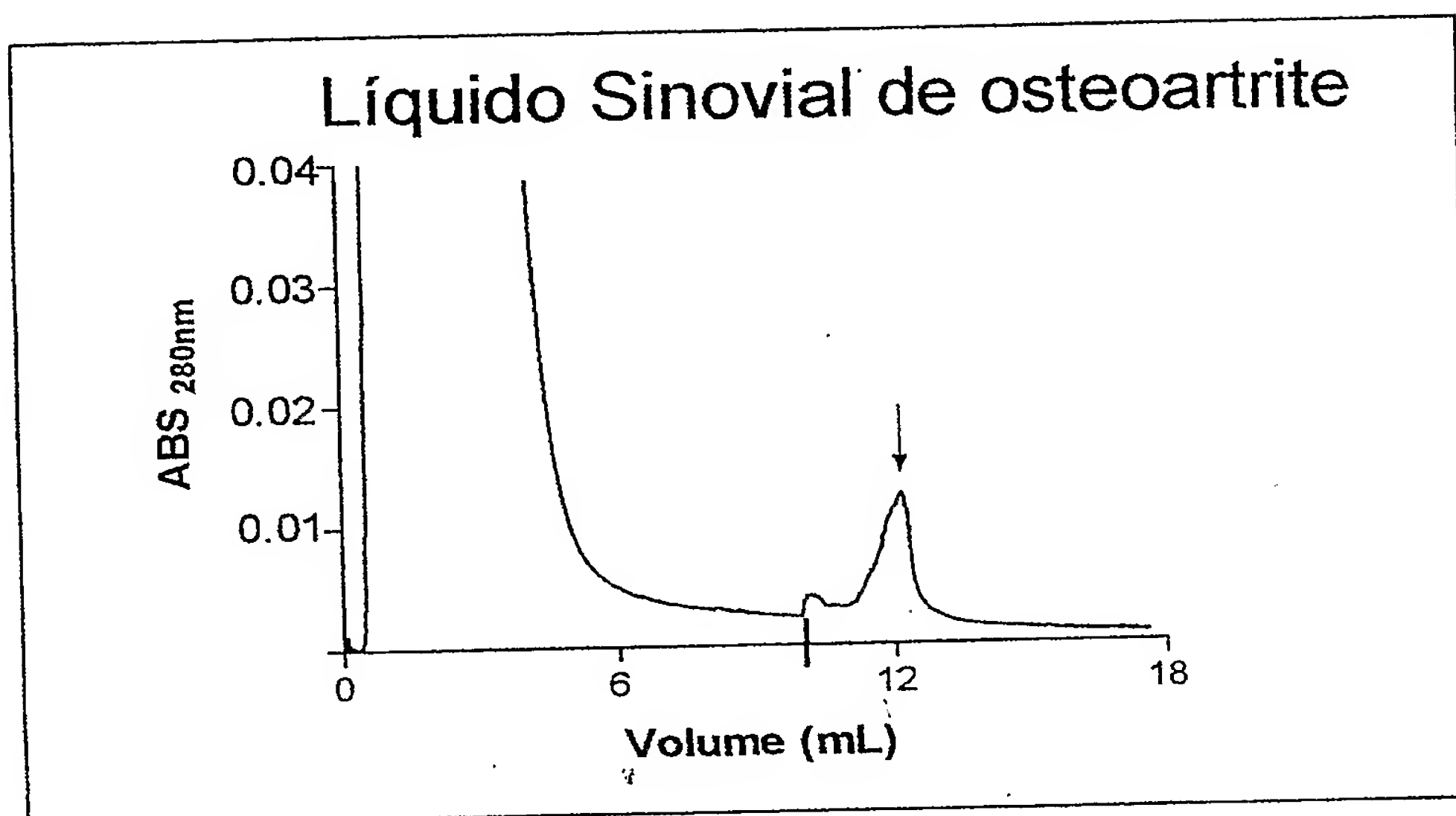


FIGURA 13

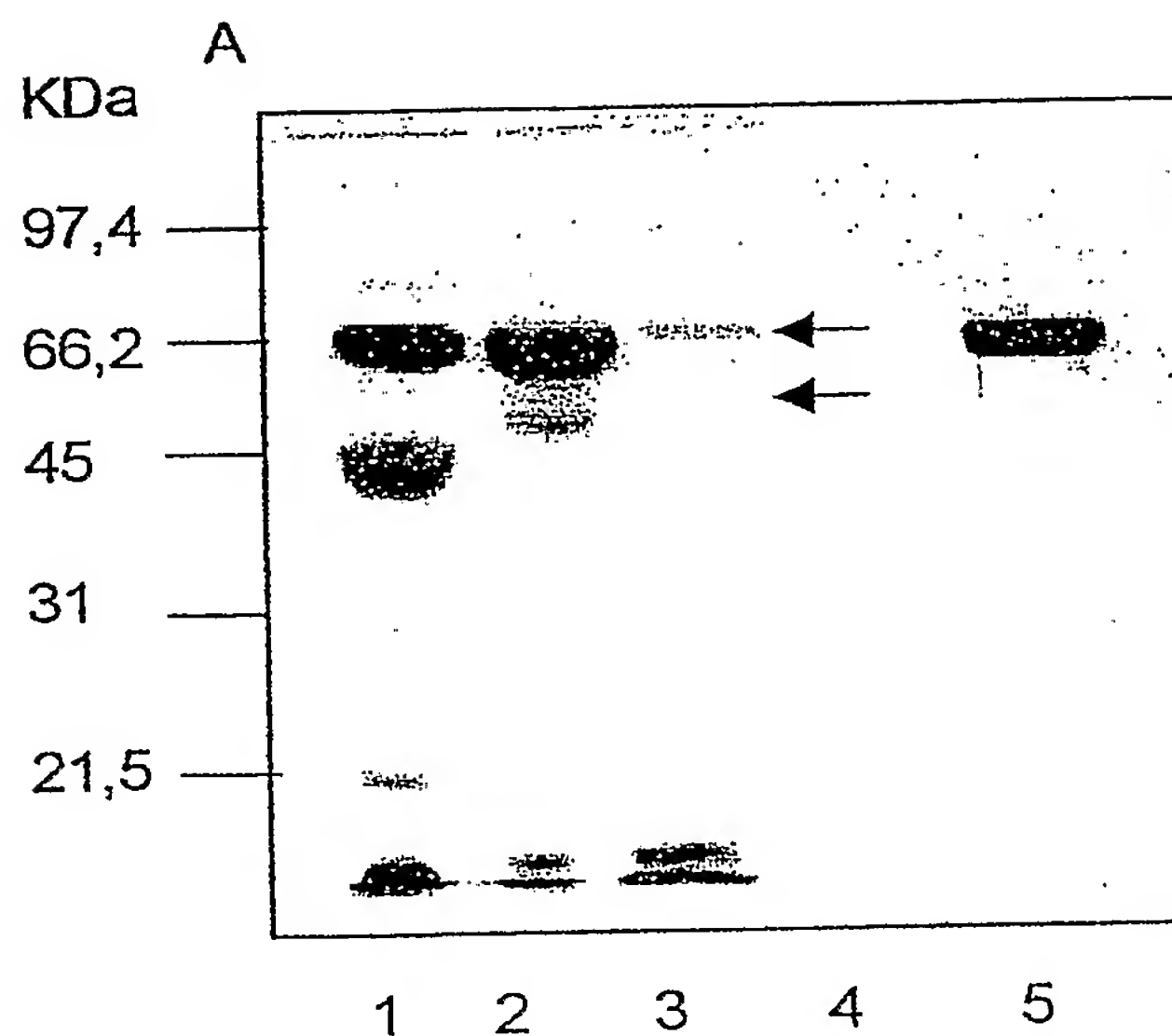


FIGURA 14A

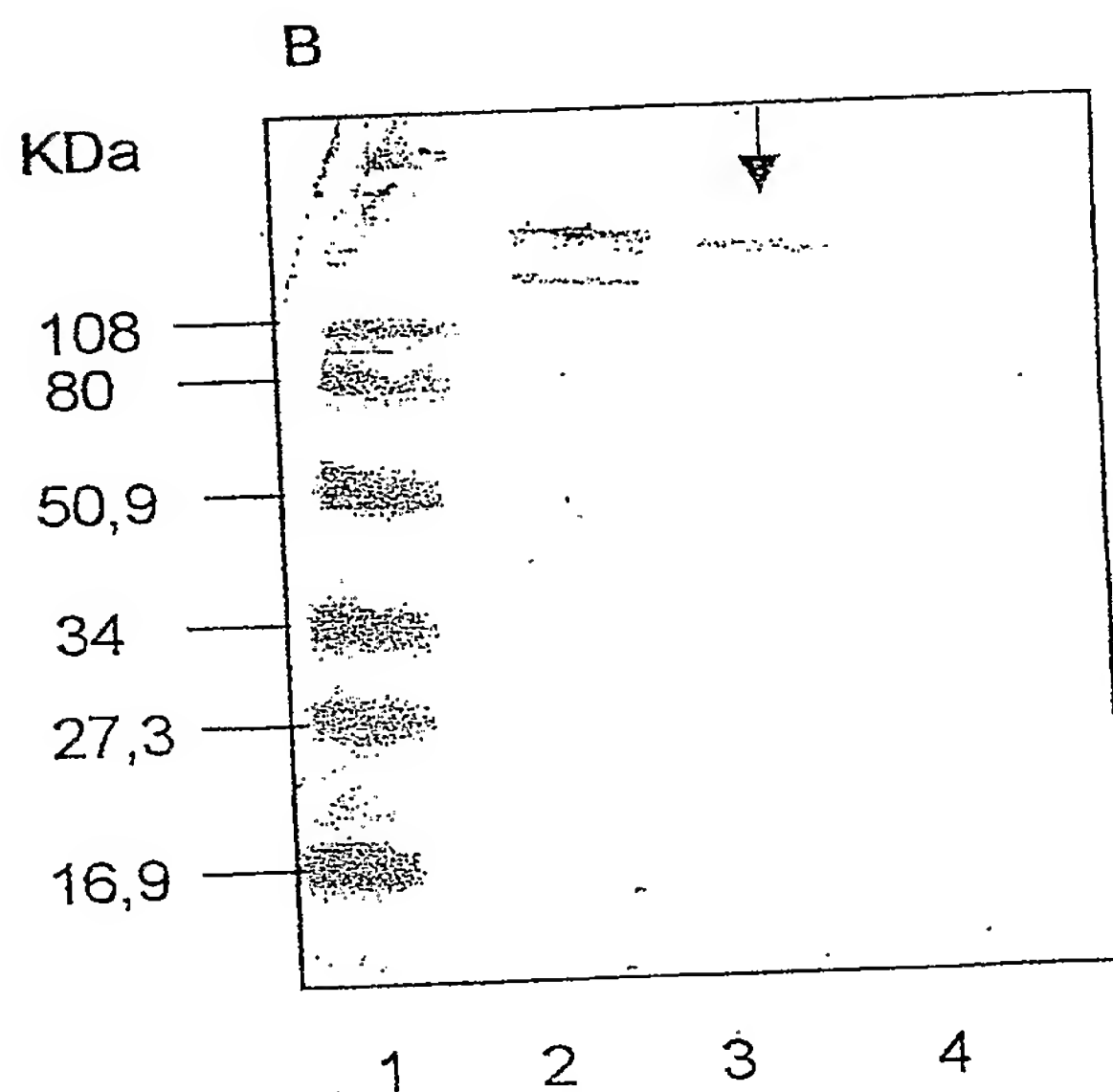


FIGURA 14B

39

40

MEMBERS OF THE MATRIKIN FAMILY

Group name	MMP number	EC number	M, latent/active	Notes
Collagenase				
Collagenase 1	MMP-1	EC 3.4.24.7	52,000 42,000	Interstitial collagenase
Collagenase 2	MMP-8	EC 3.4.24.34	85,000 64,000	Neutrophil collagenase
Collagenase 3	MMP-13		52,000 42,000	Rodent interstitial collagenase
Collagenase 4	MMP-18		53,000 42,000	<i>Xenopus</i>
Gelatinase				
Gelatinase A	MMP-2	EC 3.4.24.24	72,000 66,000	Type IV collagenase
Gelatinase B	MMP-9	EC 3.4.24.25	92,000 84,000	Type V collagenase
Stromelysin				
Stromelysin 1	MMP-3	EC 3.4.24.17	57,000 45,000	Transin
Stromelysin 2	MMP-10	EC 3.4.24.22	54,000 44,000	Transin-2
Stromelysin 3 ¹	MMP-11	EC 3.4.24.	64,000 46,000	RRKR furin cleavage
Membrane-type				
MT1-MMP	MMP-14		66,000 54,000	Transmembrane domain and RRRKR furin cleavage site
MT2-MMP	MMP-15		72,000 60,000	
MT3-MMP	MMP-16		64,000 53,000	
MT4-MMP	MMP-17		57,000 53,000	
Others				
Matrilysin	MMP-7	EC 3.4.25.33	28,000 19,000	Lacks hemopexin
Metalloelastase	MMP-12	EC 3.4.24.65	54,000 22,000	Macrophage elastase
(No trivial name) ²	MMP-19		54,000 45,000	
Enamelysin ¹	MMP-20		54,000 22,000	
Nonmammalian				
<i>Xenopus</i> XMMP ⁴			70,000 53,000	Cys in catalytic domain
Envelysin ⁴			63,000 48,000	Sea urchin
Soybean MMP ⁴			? 19,000	Protein sequencing

FIGURA 15

Resumo**USO DE DM43 E SEUS FRAGMENTOS COMO INIBIDOR DE
METALOPROTEASES DE MATRIZ**

A presente invenção está relacionada ao uso da
5 proteína DM43 como inibidor de metaloproteases. Mais
particularmente, a presente invenção está relacionada ao
uso de DM43 para terapêutica de patologias como cânceres
e osteoartrite, dependentes da inibição de metaloproteases
de matriz, baseando-se na identidade estrutural com as
10 SVMPs.